

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20785

研究課題名（和文）Borrelia miyamotoiの自然免疫回避機構に関する研究

研究課題名（英文）The innate immune evasion mechanism of Borrelia miyamotoi

研究代表者

佐藤 梢（Sato, Kozue）

国立感染症研究所・細菌第一部・流動研究員

研究者番号：70911189

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：Borrelia miyamotoiのヒト補体系に対する抵抗メカニズムの解析を実施した。本研究では、血清感受性のボレリア株にB. miyamotoi由来外膜抗原遺伝子を導入した発現ライブラリーを作成し、これら形質転換株の中から血清非感受性の形質を付与した機能未知である複数のB. miyamotoi由来遺伝子を単離した。

血清耐性を示した機能未知のタンパク質が補体経路をどのように阻害しているか調べた結果、タンパク質Aは古典経路を特異的に阻害することがわかった。また、タンパク質Bは古典経路、副経路いずれも阻害しなかったことから、膜侵襲複合体を形成する終末経路の阻害に関与することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興回帰熱病原体Borrelia miyamotoiを含む回帰熱群ボレリアでは、自然免疫機構に対する病原体の抵抗性機序の一つとして、ヒトの補体制御因子である血中H因子を介した補体系の負の制御機構が多く知られている。本研究では、B. miyamotoi由来の新規血清耐性因子が古典経路もしくは終末経路の阻害に関与し、さらに複数の因子が存在することを見出した。新規血清耐性因子の発見は、回帰熱群ボレリアだけでなく、ボレリア属全体の病原機構解明に繋がるとともに、血清耐性因子を標的とするワクチン開発等への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Borrelia miyamotoi was investigated by mechanism of resistance from human complement systems. In this study, we constructed gene library for outer membrane proteins gene of B. miyamotoi by borrelial competent cells which was a human serum-sensitive. Several transformants were showed a serum-resistant phenotype by evaluating serum sensitive assay. These unknown proteins were obtained for functional assay on complement pathway. As a result, the protein A specifically inhibited the classical pathway. Furthermore, the protein B did not inhibit either the classical pathway or the alternative pathway. So that, it is suggesting that involved in the inhibition of the terminal pathway that forms the membrane attack complex.

研究分野：マダニ媒介性感染症

キーワード：新興回帰熱 血清耐性機構 ボレリア Borrelia miyamotoi 補体制御因子 マダニ媒介性

1. 研究開始当初の背景

新興回帰熱 (*Borrelia miyamotoi* 感染症) は急性の熱性疾患であり、ヒト感染時に菌血症を起こす。このため病原体 *B. miyamotoi* は、ヒト血液中の補体系に対して抵抗性を示す何らかの病原因子を保有し、ヒト免疫機構から逃避していると考えられている。そのメカニズムとして、回帰熱群ボレリアでは、赤血球結合性等によりマクロファージなどの貪食から物理的に逃避する可能性、ならびに宿主補体系の攪乱による自然免疫の回避が知られている。これまでに *B. miyamotoi* の Outer membrane protein の一つである Complement binding and inhibitory protein A (CbiA) が補体制御因子である H 因子と結合することで血清中の C3b の分解を促進し、その結果、ボレリアが補体系への抵抗性を示すことが報告されている。また予備実験では、*B. miyamotoi* の赤血球への結合性は観察されなかったことから、*B. miyamotoi* の主要な自然免疫回避機構は宿主補体系に対する抵抗性に起因すると考えられた。一方で、他の回帰熱群ボレリア (*B. hermsii*) では、CbiA の homolog である Factor H-binding protein A (FhbA) を保有し、FhbA に H 因子が結合することでボレリアが血清耐性を示すことが報告されていた。しかしながら、*fhbA* 遺伝子破壊株においても、変異株は血清非感受性を示すことから、回帰熱群ボレリアでは CbiA/FhbA を介さない未知の血清耐性機構が存在すると考えられる。

2. 研究の目的

B. miyamotoi のヒト自然免疫機構から逃避するメカニズムの解明を目的として、これまでに、国内で分離された血清感受性のボレリア株より、形質転換効率が高く、かつ血清感受性を定量可能な *Borrelia garinii* HT59G 株 (以下、HT59G 株) の樹立にを行なった。さらに、この株を用いて *B. miyamotoi* 外膜抗原遺伝子群の発現ライブラリーを作成し、これら形質転換株の中から血清感受性を指標とし、既知とは異なる機能未知の血清耐性化に関連する 3 遺伝子 (A, B, C 遺伝子) を新たに単離した。本研究では、未解析である 3 遺伝子について、その血清耐性化機構の解析を実施し、*B. miyamotoi* の補体系を主とする自然免疫に対する抵抗性メカニズムの全容解明に迫る研究を遂行する。

3. 研究の方法

ヒトの補体系による活性化機構は概ね図1のような経路で反応が進み、補体抵抗性機構はボレリア属のみならず、多くの病原細菌で報告されている。推定されるボレリア側の補体抵抗性機構として、1) 補体系を制御する因子 (古典経路: C1 インヒビター, C4 結合タンパク質, 副経路: H 因子等) と結合し、その下流反応を抑制する可能性。2) 細菌の細胞膜上で補体成分 C9 が重合する過程を阻害する可能性 (CD59 様因子, Vitronectin など)。3) 補体系因子の分解により補体系を不活化する可能性。などが推定される。

本研究では、以下の方法で行なった。

HT59G 株に A, B, C 遺伝子を各々導入し得られた形質転換株 (以下、A 株、B 株、C 株) の生存率を見るために、抗ボレリア抗体が陰性である健常者血清、ならびにその熱不活化血清を用いた血清感受性試験を行った。生成されたコロニー数から生存率を算出した。

血清非感受性化 (耐性化) を示した遺伝子の機能について、古典経路ならびに副経路の補体活性化の阻害を確認した。各々の遺伝子を大腸菌に導入し得られたリコンビナントタンパク質 (以下、タンパク質 A, B, C) に健常者血清を反応させた。その後、ELISA キット (Wieslab Complement System) を使用し、血清中の補体活性化で形成される最終産物膜侵襲複合体 (membrane attack complex, MAC) を抗 C5b-9 抗体の反応により検出した。

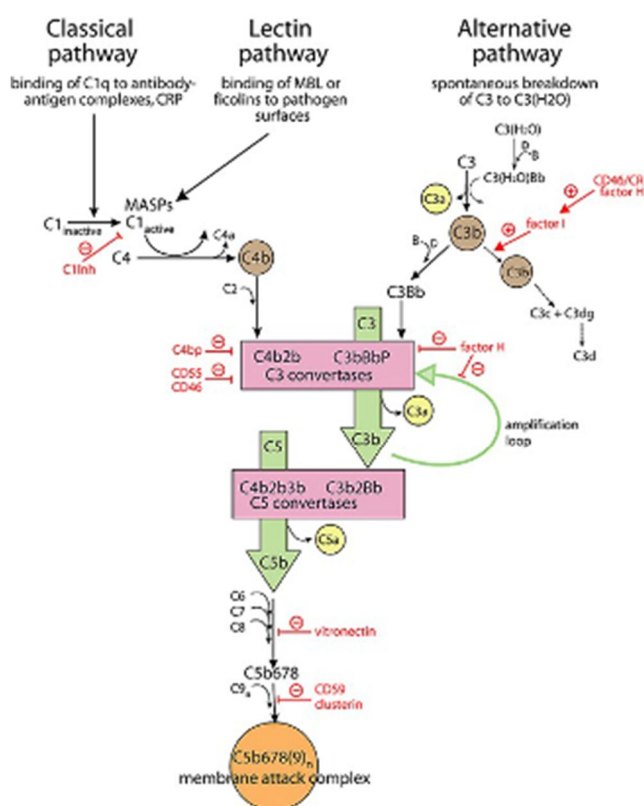


図1. ヒト補体系による活性化機構の概略

その後、ELISA キット (Wieslab Complement System) を使用し、血清中の補体活性化で形成される最終産物膜侵襲複合体 (membrane attack complex, MAC) を抗 C5b-9 抗体の反応により検出した。

病原体のヒト血清に対する耐性メカニズムとして、補体系を負に制御する因子との結合が重要であることが多い。このことから、血清耐性を示した形質転換株、もしくはリコンビナントタンパク質と結合する血清中の補体系因子の検出を試みた。具体的には、補体反応に関わる成分に対する抗体を用いて、[1] Affinity ligand binding assay, [2] Far western assay, ならびに [3] Pull-down assay を実施した。

4. 研究成果

血清感受性である HT59G 株に A, B, C 遺伝子を各々導入し、形質転換株（以下、A 株、B 株、C 株）を得た。各々の形質転換株に抗ボレリア抗体が陰性である健康者血清、ならびにその熱不活化血清を反応後、培養を行なった。生成されたコロニー数から生存率を算出した結果、A 株:21.1%、B 株:24.8% C 株:5.7%を示し、HT59G 株に空ベクターを導入した陰性対照株:0.2%との比較では、いずれの株も生存率に有意な差が見られた。

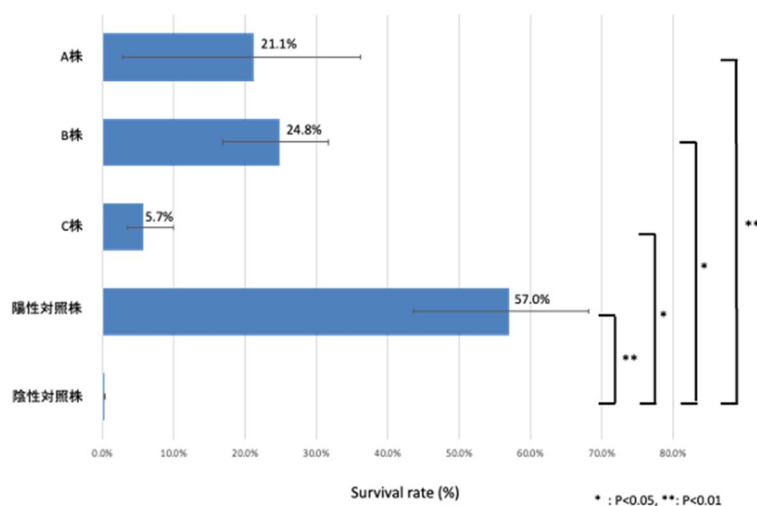


図2. 形質転換株の血清感受性試験

次に、前述の実験で生存率が比較的高く見られたタンパク質 A ならびに B について、古典経路または副経路の活性化阻害を調べた結果、タンパク質 A は古典経路を特異的に阻害することが明らかとなった。一方で、タンパク質 B は、古典経路、副経路いずれも阻害しなかったことから、MAC を形成する終末経路の阻害に関与することが考えられた。

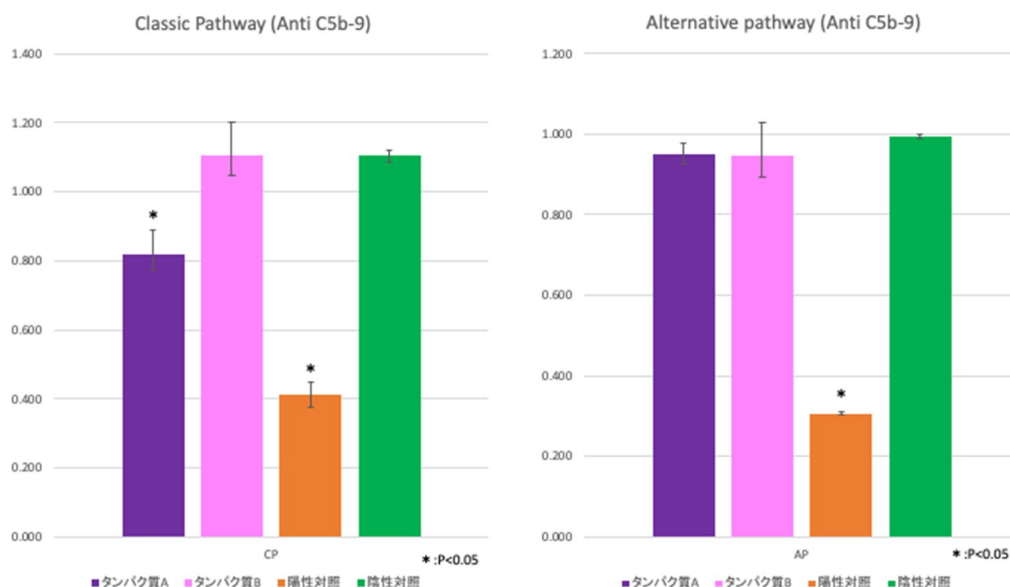


図3. 補体経路の活性化試験

最後に、ボレリア属のヒト血清に対する耐性メカニズムとして、古典経路では補体系を負に制御する因子 C1 インヒビター (C1-INH) または C4 結合タンパク質 (C4bp) と結合することで、補体系に抵抗を示すことが報告されている。そこで、古典経路を阻害した A 株ならびにタンパク質 A を抗原として、方法で述べた [1] から [3] のアッセイで抗 C1-INH 抗体ならびに抗 C4 bp の検出を試みたが、特異的な反応は見出せなかった。

本研究では、*B. miyamotoi* 由来の新規血清耐性因子が古典経路もしくは終末経路の阻害に関与することを明らかにし、さらに複数の因子が血清耐性に関与していることを見出した。新規血清耐性因子の発見は、回帰熱群ボレリアだけでなく、ボレリア属全体の病原機構解明に繋がるとともに、血清耐性因子を標的とするワクチン開発等への発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------